

PCT

## 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

世界知的所有権機関  
国際事務局(51) 国際特許分類6  
C12Q 1/60

A1

(11) 国際公開番号

WO97/45553

(43) 国際公開日

1997年12月4日(04.12.97)

(21) 国際出願番号

PCT/JP97/01232

(22) 国際出願日

1997年4月10日(10.04.97)

(30) 優先権データ

特願平8/134727

1996年5月29日(29.05.96)

JP

(81) 指定国 AU, CA, CN, KR, MX, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

添付公開書類  
国際調査報告書

(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について)

第一化学薬品株式会社

(DAIICHI PURE CHEMICALS CO., LTD.)[JP/JP]

〒103 東京都中央区日本橋3丁目13番5号 Tokyo, (JP)

(72) 発明者 ; および

(75) 発明者／出願人 (米国についてのみ)

中村光浩(NAKAMURA, Mitsuhiro)[JP/JP]

中西一夫(NAKANISHI, Kazuo)[JP/JP]

日野浩一(HINO, Koichi)[JP/JP]

真鍋満久(MANABE, Mitsuhsisa)[JP/JP]

〒301 茨城県竜ヶ崎市向陽台3-3-1

第一化学薬品株式会社 つくば開発研究所内 Ibaraki, (JP)

(74) 代理人

弁理士 有賀三幸, 外(ARUGA, Mitsuyuki et al.)

〒103 東京都中央区日本橋人形町1丁目3番6号

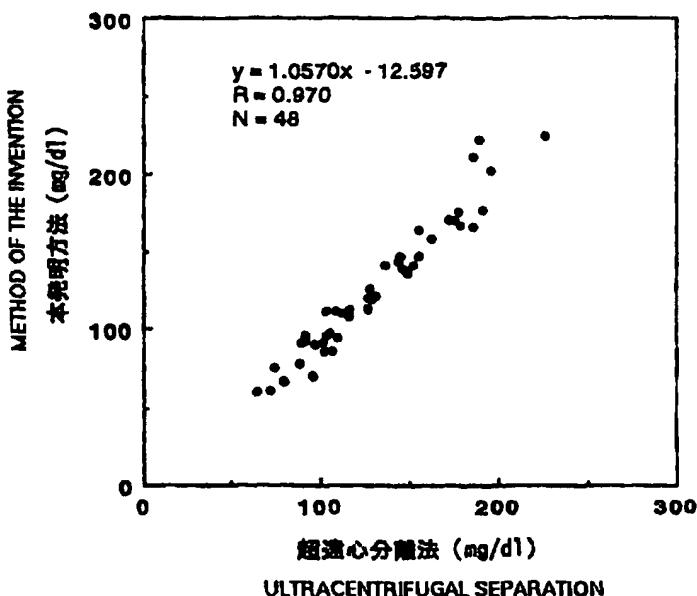
共同ビル Tokyo, (JP)

(54) Title: METHOD FOR QUANTITATIVELY DETERMINING LDL CHOLESTEROLS

(54) 発明の名称 LDLコレステロールの定量方法

## (57) Abstract

A method for quantitatively determining LDL cholesterol, comprising adding a surfactant selected among polyoxyethylenealkylene phenyl ethers and polyoxyethylenealkylene tribenzylphenyl ethers and a cholesterol assaying enzyme reagent to the serum to preferentially react HDL and VLDL cholesterol among lipoproteins and then determining the amounts of the cholesterol reacted thereafter. This method can eliminate the necessity for pretreatments such as centrifugation and electrophoresis, enables the quantitative determination to be efficiently conducted in a simple manner, and can be applied to various automatic analyzers.



## (57) 要約

本発明は、血清に対し、ポリオキシエチレンアルキレンフェニルエーテル及びポリオキシエチレンアルキレントリベンジルフェニルエーテルから選ばれる界面活性剤、並びにコレステロール測定用酵素試薬を添加し、リポタンパク質のうちHDL中及びVLDL中のコレステロールを優先的に反応させた後に、その後のコレステロールの反応量を測定するLDLコレステロールの定量方法に関する。この定量方法は遠心分離、電気泳動等の前処理の必要性がなく、簡便な操作で効率良く測定することができ、種々の自動分析機に適用できる。

## 参考情報

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に記載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード

|    |              |    |             |    |          |    |            |
|----|--------------|----|-------------|----|----------|----|------------|
| AL | アルバニア        | ES | スペイン        | LR | リベリア     | SG | シンガポール     |
| AM | アルメニア        | FI | フィンランド      | LS | レソト      | SI | スロヴェニア     |
| AT | オーストリア       | FR | フランス        | LT | リトアニア    | SK | スロヴァキア共和国  |
| AU | オーストラリア      | GA | ガボン         | LU | ルクセンブルグ  | SL | シエラレオネ     |
| AZ | アゼルバイジャン     | GB | 英國          | LV | ラトヴィア    | SN | セネガル       |
| BA | ボスニア・ヘルツェゴビナ | GE | グルジア        | MC | モナコ      | SZ | スワジ蘭       |
| BB | バルバドス        | GH | ガーナ         | MD | モルドバ共和国  | TD | チャード       |
| BE | ベルギー         | GM | ガンビア        | MG | マダガスカル   | TG | トーゴ        |
| BF | ブルガリア        | GN | ギニア         | MK | マケドニア共和国 | TJ | タジキスタン     |
| BG | ブルガリア        | GR | ギリシャ        | MN | ラヴィア共和国  | TM | トルクメニスタン   |
| BJ | ベナン          | HU | ハンガリー       | ML | マリ       | TR | トルコ        |
| BR | ブラジル         | ID | インドネシア      | MN | モンゴル     | TT | トリニダード・トバゴ |
| BY | ベラルーシ        | IE | アイルランド      | MR | モーリタニア   | UA | ウクライナ      |
| CA | カナダ          | IL | イスラエル       | MW | マラウイ     | UG | ウガンダ       |
| CF | 中央アフリカ共和国    | IS | アイスランド      | MX | メキシコ     | US | 米國         |
| CG | コンゴー         | IT | イタリア        | NE | ニジェール    | UZ | ウズベキスタン    |
| CH | スイス          | JP | 日本          | NL | オランダ     | VN | ヴィエトナム     |
| CI | コート・ジボアール    | KE | ケニア         | NO | ノルウェー    | YU | ユーゴスラビア    |
| CM | カメルーン        | KG | キルギスタン      | NZ | ニュージーランド | ZW | ジンバブエ      |
| CN | 中国           | KP | 朝鮮民主主義人民共和国 | PL | ポーランド    |    |            |
| CU | キューバ         | KR | 大韓民国        | PT | ポルトガル    |    |            |
| CZ | チェコ共和国       | KZ | カザフスタン      | RO | ルーマニア    |    |            |
| DE | ドイツ          | LC | セントルシア      | RU | ロシア連邦    |    |            |
| DK | デンマーク        | LI | リヒテンシュタイン   | SD | スダーン     |    |            |
| EE | エストニア        | LK | スリランカ       | SE | スウェーデン   |    |            |

WO 97/45553

PCT/JP97/01232

## 明細書

### LDLコレステロールの定量方法

#### 技術分野

本発明は、遠心分離、電気泳動等の分離操作の必要がなく、少ない試料で簡便な操作により効率良く低比重リポタンパク質 (Low Density Lipoprotein; LDL) 中のコレステロールとLDL以外のリポタンパク質中のコレステロールとを分別定量する方法に関する。

#### 背景技術

コレステロール等の脂質は、血清中においてアボタンパクと結合し、リポタンパク質を形成している。リポタンパク質は物理的な性状の違いにより、カイロミクリン、超低比重リポタンパク質 (Very Low Density Lipoprotein; VLDL) 、低比重リポタンパク質 (Low Density Lipoprotein; LDL) 、高比重リポタンパク質 (High Density Lipoprotein; HDL) 等に分類される。これらのリポタンパク質のうち、LDLは動脈硬化を引き起こす原因物質の一つであることが知られている。

疫学的には、LDL中のコレステロール値は、動脈硬化性疾患の発症頻度と強く相関することが証明されており、日常的に簡便な方法でLDLコレステロールの測定が可能となれば臨床上極めて有用である。

従来のLDLコレステロールの測定方法としては、例えば超遠心分離によってLDLを他のリポタンパク質と分離した後に、コレステロール測定に供する方法や、電気泳動によって分離した後に脂質の染色を行って、その発色強度を測定する方法が知られている。しかしながらこれらの方法はいずれも、操作が煩雑であったり、多数の検体を処理できないなどの問題があり、日常的にはほとんど用いられていない。また、担体にLDL以外のリポタンパク質に結合する抗体を作成しておき、試料と混和後結合しなかった分画を分取して、その分画中のコレステロールを測定する方法も知られている。この方法は、先の二つの方法に比較して日常的な測定に適した方法とはいえるが、用手法で行う工程を測定操作中に含むことから自

WO 97/45553

PCT/JP97/01232

動化が困難であり、やはり多數検体の処理には向きであった。

一方、遠心分離、電気泳動等の物理的な分離手段を用いずに試料中のリボタンパク質を分別定量する方法としては、HDLとその他のリボタンパク質、すなわちカイロミクロン、VLDL及びLDLに対する、コレステロール測定に用いられる酵素（主としてコレステロールオキシダーゼ及びコレステロールエステラーゼ）の反応性を制御し、HDLコレステロールのみを酵素反応に導き定量する測定法が知られている。例えば、特開平7-301636号公報によれば、界面活性剤及び糖化合物を用いることにより、HDLコレステロールのみを測定する方法が開示され、特開平6-242110号公報によれば、測定すべきリボタンパク質以外のリボタンパク質中のコレステロールのみを検出する方法が開示されている。これらの方法は、自動分析機に適用可能であり全工程を自動化できることから極めて有用ではあるが、あくまでもHDLとHDL以外のリボタンパク質を分別定量するに止まり、更にLDLとVLDL及びカイロミクロンとを分別定量することはできない。従って、これらの技術では、分離手段を用いずにLDLコレステロールを測定するという目的には、対応することができない。

また、特開平7-280812号公報では、LDLを一旦凝集させた後に、他のリボタンパク質中のコレステロールをLDLの定量系に関与しない系に導き、LDLの凝集を溶解した後にLDLコレステロールを反応させることによって定量を行う方法が開示されている。しかしながらこの公報においても、先に述べた二つの特許公開公報と同様に、LDLコレステロールの測定には絶対的に不可欠な、LDLとVLDL及び／又はカイロミクロンとの分別定量に対する解決法は全く提示されていない。また、測定に必要な反応工程数が多いため一般的な自動分析装置には適用できず、その利用価値も極めて限定されるという問題がある。

このように、従来知られている技術では、分離操作を行わずにLDLコレステロールを効率良く測定することは不可能であるばかりか、その可能性を示唆する情報も存在しない。

従って、本発明の目的は、遠心分離、電気泳動等の前処理の必要性がなく、簡便な操作で効率良く測定することができ、種々の自動分析機に適用できるLDLコ

WO 97/45553

PCT/JP97/01232

コレステロールの分別定量法を提供することにある。

### 発明の開示

かかる実情において、本発明者等は鋭意研究を行った結果、リポタンパク質を溶解する特定の界面活性剤の存在下でコレステロール測定用酵素試薬との反応を行えば、HDL及びVLDL中のコレステロールの反応が加速される一方LDL中のコレステロールの反応が著しく遅れ、HDL中及びVLDL中のコレステロールの反応がLDL中のコレステロールの反応に先んじて終結するために、測定ポイントを適宜選択することにより、LDLコレステロールを分別測定することができ、しかも自動分析装置にも適用できることを見出し、本発明を完成した。

すなわち本発明は、血清に対し、ポリオキシエチレンアルキレンフェニルエーテル及びポリオキシエチレンアルキレントリベンジルフェニルエーテルから選ばれる界面活性剤、並びにコレステロール測定用酵素試薬を添加し、リポタンパク質のうちHDL中及びVLDL中のコレステロールを優先的に反応させた後に、その後のコレステロールの反応量を測定することを特徴とするLDLコレステロールの定量方法を提供するものである。

また本発明は、血清に対し、ポリオキシエチレンアルキレンフェニルエーテル及びポリオキシエチレンアルキレントリベンジルフェニルエーテルから選ばれる界面活性剤、VLDLに対してLDLに対するよりも強い結合親和性を示す物質、並びにコレステロール測定用酵素試薬を添加し、リポタンパク質のうちHDL中及びVLDL中のコレステロールを優先的に反応させた後に、その後のコレステロールの反応量を測定することを特徴とするLDLコレステロールの定量方法を提供するものである。

更に本発明は、ポリオキシエチレンアルキレンフェニルエーテル及びポリオキシエチレンアルキレントリベンジルフェニルエーテルから選ばれる界面活性剤、並びにコレステロール測定用酵素試薬を含むLDLコレステロールの定量用キットを提供するものである。

更にまた本発明は、更にVLDLに対してLDLに対するよりも強い結合親和性を示す物質を含む、該定量用キットを提供するものである。

WO 97/45553

PCT/JP97/01232

### 図面の簡単な説明

図1は、実施例1における本発明方法によるLDLコレステロールの測定値と、超遠心分離法によるLDLコレステロールの測定値との相関性を示す図である。

図2は、実施例2における本発明方法によるLDLコレステロールの測定値と、超遠心分離法によるLDLコレステロールの測定値との相関性を示す図である。

図3は、実施例3における本発明方法によるLDLコレステロールの測定値と、超遠心分離法によるLDLコレステロールの測定値との相関性を示す図である。

### 発明を実施するための最良の形態

本発明で用いられるポリオキシエチレンアルキレンフェニルエーテル及びポリオキシエチレンアルキレントリベンジルフェニルエーテルから選ばれる界面活性剤は、リポタンパク質を溶解する界面活性剤であり、市販品としては、前者の例としてエマルゲンA-60（花王社製）等が、後者の例としてエマルゲンB66（花王社製）等が挙げられる。かかる界面活性剤は、単独で又は2種以上を組み合わせて用いることができ、またその使用量は化合物によって異なり、特に制限されるものでないが、試薬を適用すべき分析装置ごとに望ましい測定時間内に、LDLコレステロールが検出できる感度となるよう、通常0.01～2重量%の濃度にて使用するのが好ましい。

また、本発明の測定方法は、更にVLDLに対してLDLに対するよりも強い結合親和性を示す物質の存在下で行うことが好ましく、特に、乳びを有する血清を検体とする場合には当該物質を添加して測定を行うと良好な結果が得られる。このような物質としては、ポリアニオン、2価金属塩を生成する物質等が挙げられ、具体的には、ポリアニオンとしては、リンタンゲステン酸及びその塩、テキストラン硫酸、ヘパリン等が、2価金属イオンを生成する物質としては、 $MgCl_2$ 、 $CaCl_2$ 、 $MnCl_2$ 、 $NiCl_2$ 等の2価金属の塩化物、これらの水和物等が挙げられる。これらの物質は、単独で又は2種以上を組み合わせて用いることができ、またその使用量は物質の種類によって異なり、特に限定されるものでないが、反応終濃度として、ポリアニオンの場合には0.002～10重量%、2価金属イオンを生成す

WO 97/45553

PCT/JP97/01232

る物質の場合には0.01～1重量%となる範囲で用いるのが望ましい。

界面活性剤及びVLDLに対してLDLに対するよりも強い結合親和性を示す物質を検体である血清へ添加するに際しては、前者及び後者並びにコレステロール測定用酵素試薬を別途に添加しても、前者又は後者のいずれか一方と他方及びコレステロール測定用酵素試薬の混合物とを別個に添加しても、また三者を混合して同一の試薬として添加しても良い。

コレステロールの測定方法としては、公知の酵素的測定方法のいずれをも用いることができるが、例えば酵素試薬としてコレステロールエステラーゼ及びコレステロールオキシダーゼを組み合わせて用いる方法、コレステロールエステラーゼ及びコレステロールデヒドロゲナーゼを組み合わせて用いる方法等が挙げられる。これらのうち、コレステロールエステラーゼ及びコレステロールオキシダーゼを組み合わせて用いる方法が好ましい。またこれらのコレステロール測定用酵素試薬を添加した後、最終的にコレステロールを検出する方法は特に制限されず、例えばパーオキシダーゼと色原体を更に組み合わせて行う吸光度分析、補酵素や過酸化水素を直接検出する方法等が挙げられる。

LDLコレステロールの反応を検出するためには、LDL以外のリポタンパク質中のコレステロールの反応が終結した後の反応量を測定する必要があり、一定時間反応させてLDL以外のリポタンパク質中のコレステロールの反応がほぼ完了した後に、進行する反応を動力学的にモニターする方法や、更にLDLの反応を促進する目的で別途反応促進剤を添加し生じる反応を反応終末点法で測定してブランク値にて補正する方法（2ポイント法）を用いることができる。2ポイント法において用いられる反応促進剤としては、LDL以外のリポタンパク質中のコレステロールの反応に用いたのと同じ界面活性剤をより高濃度で用いることができるほか、別の種類の界面活性剤を用いることもできる。また、2ポイント法においては、LDL以外のリポタンパク質中のコレステロールの反応時に、コレステロールを次工程におけるLDLコレステロールの定量系に関与しない別の反応系に導きLDLコレステロールの反応のみを検出することも可能である。

なお、血清中に存在する他のリポタンパク質として、通常食物摂取直後にのみ出現するカイロミクロンが挙げられるが、このものはその反応性がVLDLとほぼ同

WO 97/45553

PCT/JP97/01232

じである。このため、血清中にカイロミクロンが存在する場合にも、ポリアニオン、2価金属イオンを生成する物質等の添加により、VLDLと同様にカイロミクロンの反応性も促進されVLDLの反応終了時にはカイロミクロンの反応も終了するので、その後のコレステロールの反応量を測定することにより、LDLコレステロールの分別定量が可能である。

### 実施例

次に、実施例を挙げて本発明を更に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

#### 実施例 1

正脂血清を試料とし、本発明方法によりLDLコレステロールを日立7070型自動分析装置によって測定し、その測定値を超遠心分離法によって得られる測定値と比較した。この結果を図1に示す。

すなわち、検体 $4\text{ }\mu\text{l}$ に、リンタングステン酸ナトリウム0.02重量%及び $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.2重量%を含む試薬 $300\text{ }\mu\text{l}$ を添加した。次に約5分後、エマルゲンA-60（花王社製）0.5重量%、コレステロールエステラーゼ $1\text{U}/\text{ml}$ 、コレステロールオキシダーゼ $1\text{U}/\text{ml}$ 、パーオキシダーゼ $1\text{U}/\text{ml}$ 、4-アミノアンチピリン0.005重量%及びN,N-ジメチルメタトルイジン0.04重量%を含むコレステロール測定試薬 $100\text{ }\mu\text{l}$ を加え、第2試薬添加1分後から5分後までの $545\text{nm}$ における吸光度変化を測定した。

一方、超遠心分離法は、血清を超遠心機にて $100,000\text{g}$ 、2時間遠心して上層を除去した。得られた下層から $1\text{ ml}$ を採り、ヘパリン（5000usp単位/ $\text{ml}$ ）溶液 $40\text{ }\mu\text{l}$ 及び $\text{MgCl}_2$ （1M）溶液 $50\text{ }\mu\text{l}$ を加え、5000回転で30分遠心して上清を得た。超遠心分離によって得られた下層の溶液（LDL及びHDLを含む）、並びにヘパリン及び $\text{MgCl}_2$ 溶液を加えて得られた分画上清（HDLを含む）をコレステロール測定に付し、両者の値の差し引き値をLDLコレステロール値とした（参考文献：Paul S. Bachorik et al., Clin. Chem. 41/10, 1414-1420, 1955）。

図1に示すように、本発明方法は用いる試料がわずかでよく、簡便な操作で行うことができるにもかかわらず、従来の超遠心分離法と良好な相関性を有する測

WO 97/45553

PCT/JP97/01232

定値が得られた。

### 実施例 2

トリグリセライド値が高度に上昇した乳び血清を含む検体を試料とし、本発明方法によりLDLコレステロールを日立7070型自動分析装置によって測定し、その測定値を超遠心分離法によって得られる測定値と比較した。この結果を図2に示す。

すなわち、検体 $4\mu l$ に、エマルゲンB66（花王社製）0.5重量%、コレステロールエステラーゼ $0.3U/ml$ 、コレステロールオキシダーゼ $0.3U/ml$ 、パーオキシダーゼ $0.3U/ml$ 、及び4-アミノアンチピリン0.002重量%を含む試薬 $300\mu l$ を添加した。次に約5分後、トライトンX-100 1重量%及びN,N-ジメチルメタトルイジン0.04重量%を含む試薬 $100\mu l$ を加え、第2試薬添加5分後の $545nm$ における吸光度から第2試薬添加直前の $545nm$ における吸光度（試薬量の変化を考慮して補正を行う）を差し引いて、その吸光度変化を測定した。

一方、超遠心分離法は、実施例1と同様に実施した。

図2に示すように、実施例1と同様、従来の超遠心分離法によるLDLコレステロール測定値と良好な相関性を有する測定値が得られた。

### 実施例 3

実施例2において、第1試薬中に更にリンタンクスティン酸0.3重量%を含有せしめる以外は、同じ検体及び試薬を用いて同様に操作し、本発明方法による測定値を超遠心分離法によって得られる測定値と比較した。この結果を図3に示す。

図3に示すように、乳び血清を含む血清試料を用いても実施例1と同様、従来の超遠心分離法によるLDLコレステロール測定値と極めて良好な相関性を有する測定値が得られた。

### 産業上の利用可能性

本発明によれば、遠心分離、電気泳動等の分離操作の必要がなく、簡便な操作で効率良くLDL中のコレステロールをその他のリポタンパク質中のコレステロールと分別定量することができ、臨床検査において用いられる自動分析装置に広く適用できるため、臨床上極めて有用である。

WO 97/45553

PCT/JP97/01232

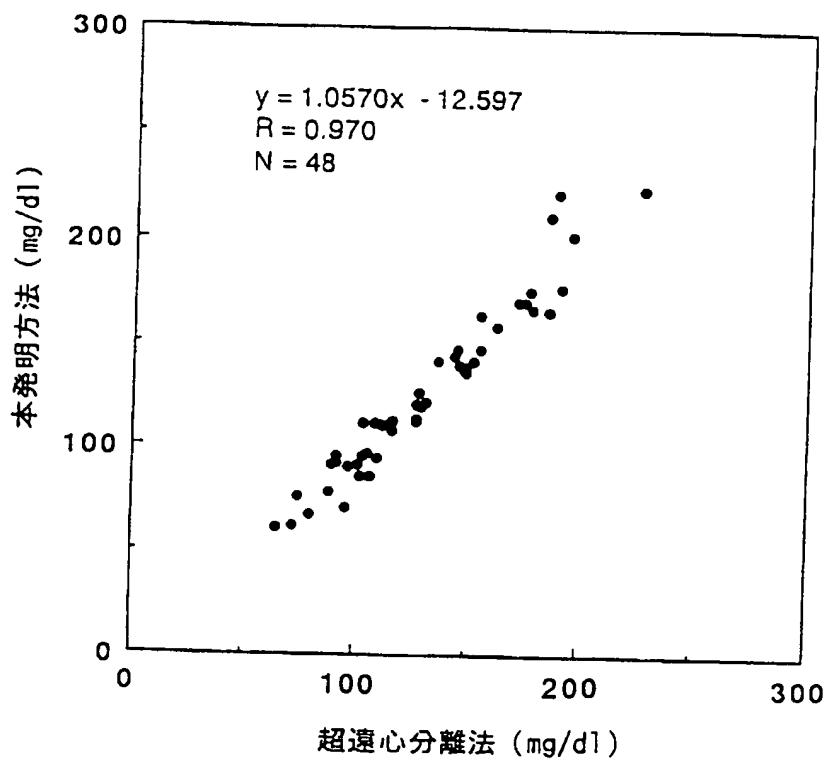
## 請求の範囲

1. 血清に対し、ポリオキシエチレンアルキレンフェニルエーテル及びポリオキシエチレンアルキレントリベンジルフェニルエーテルから選ばれる界面活性剤、並びにコレステロール測定用酵素試薬を添加し、リポタンパク質のうち高比重リポタンパク質中及び超低比重リポタンパク質中のコレステロールを優先的に反応させた後に、その後のコレステロールの反応量を測定することを特徴とする低比重リポタンパク質コレステロールの定量方法。
2. 血清に対し、ポリオキシエチレンアルキレンフェニルエーテル及びポリオキシエチレンアルキレントリベンジルフェニルエーテルから選ばれる界面活性剤、超低比重リポタンパク質に対して低比重リポタンパク質に対するよりも強い結合親和性を示す物質、並びにコレステロール測定用酵素試薬を添加し、リポタンパク質のうち高比重リポタンパク質中及び超低比重リポタンパク質中のコレステロールを優先的に反応させた後に、その後のコレステロールの反応量を測定することを特徴とする低比重リポタンパク質コレステロールの定量方法。
3. 超低比重リポタンパク質に対して低比重リポタンパク質に対するよりも強い結合親和性を示す物質が、ポリアニオン又は2価金属イオンを生成する物質である請求項2記載の低比重リポタンパク質コレステロールの定量方法。
4. ポリオキシエチレンアルキレンフェニルエーテル及びポリオキシエチレンアルキレントリベンジルフェニルエーテルから選ばれる界面活性剤、並びにコレステロール測定用酵素試薬を含む低比重リポタンパク質コレステロールの定量用キット。
5. 更に超低比重リポタンパク質に対して低比重リポタンパク質に対するよりも強い結合親和性を示す物質を含む請求項4記載の定量用キット。

WO 97/45553

PCT/JP97/01232

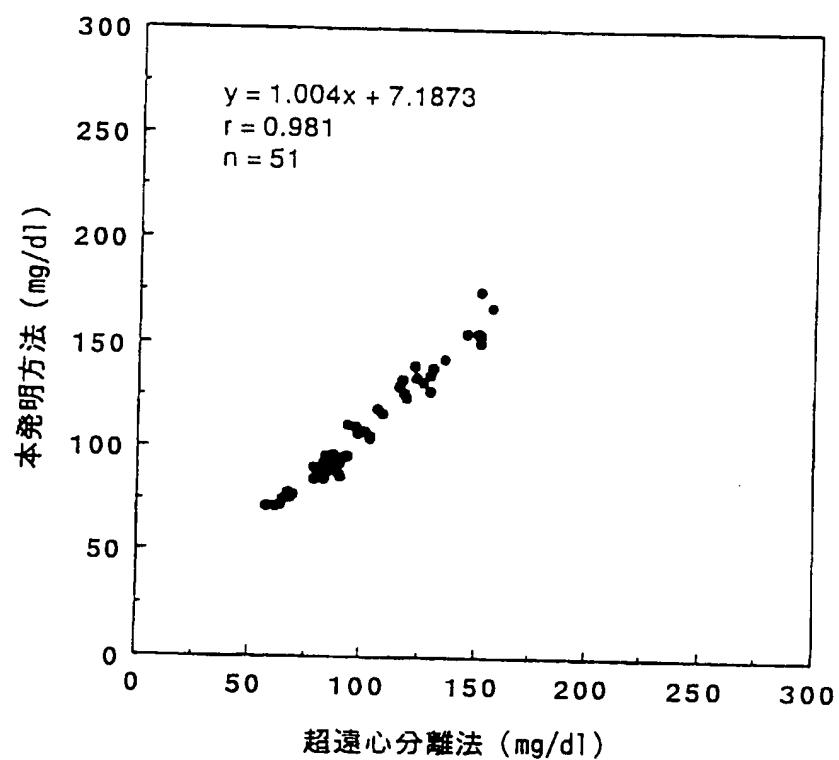
図 1



WO 97/45553

PCT/JP97/01232

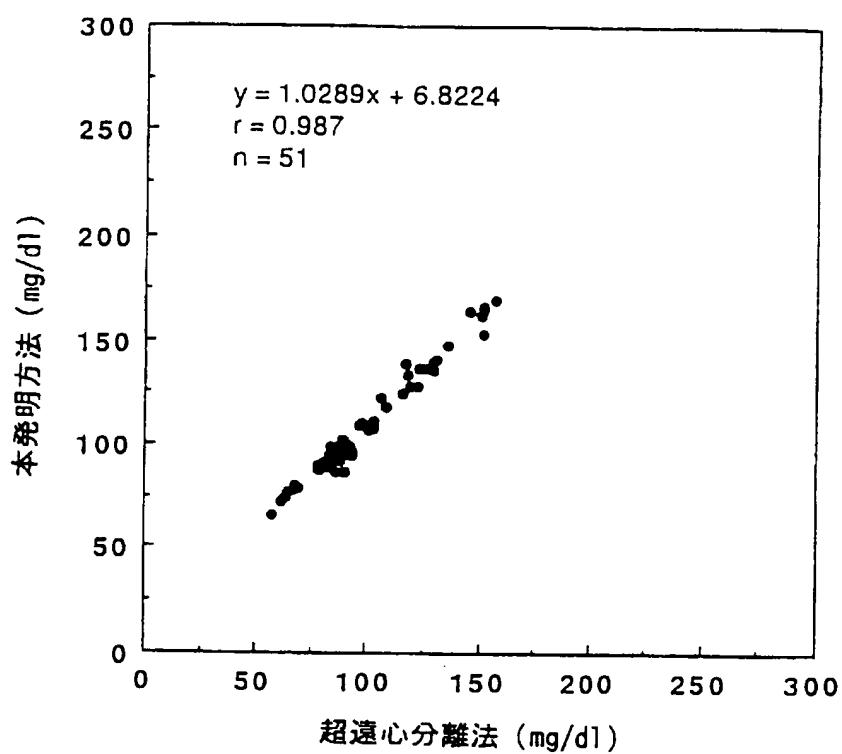
図 2



WO 97/45553

PCT/JP97/01232

図 3



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP97/01232

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**Int. C1<sup>6</sup> C12Q1/60

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. C1<sup>6</sup> C12Q1/60

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

Medline

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| A         | JP, 7-301636, A (Kyowa Medex Co., Ltd.), November 14, 1995 (14. 11. 95)<br>& WO, 9524647, A1 & AU, 9518620, A<br>& EP, 698791, A1                                      | 1 - 5                 |
| A         | JP, 62-69999, A (Boehringer Mannheim GmbH.), March 31, 1987 (31. 03. 87)<br>& DE, 3533288, A & EP, 218127, A<br>& US, 48513335, A & FI, 8603752, A<br>& KR, 8903948, B | 1 - 5                 |
| A         | JP, 58-33012, A (Boehringer Mannheim GmbH.), September 30, 1983 (30. 09. 83)<br>& EP, 88420, A & DE, 3208253, A<br>& US, 4544630, A                                    | 1 - 5                 |
| A         | JP, 63-126498, A (Boehringer Mannheim GmbH.), May 30, 1988 (30. 05. 88)<br>& EP, 265933, A & DE, 3636851, A<br>& US, 4892815, A  | 1 - 5                 |

Further documents are listed in the continuation of Box C.  See patent family annex.

- \* Special categories of cited documents:
- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

|   |  |
|---|--|
| Date of the actual completion of the international search<br>June 13, 1997 (13. 06. 97) | Date of mailing of the international search report<br>June 24, 1997 (24. 06. 97) |
| Name and mailing address of the ISA/<br>Japanese Patent Office<br>Facsimile No.         | Authorized officer<br>Telephone No.  |

|   |  |  |      |
|---|--|--|------|
| 国際調査報告  |  | 国際出願番号 PCT/JP97/01232                        |      |
| A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））   |  |  |      |
| Int. C1° C12Q1/60   |  |  |      |
| B. 調査を行った分野<br>調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））   |  |  |      |
| Int. C1° C12Q1/60   |  |  |      |
| 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの  |  |  |      |
| 国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）  |  |  |      |
| Medline   |  |  |      |
| C. 関連すると認められる文献   |  |  |      |
| 引用文献の<br>カテゴリー*   | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示  | 関連する<br>請求の範囲の番号                             |      |
| A   | JP, 7-301636, A (協和メデックス株式会社) 14. 11月. 1995(14. 11. 95)&WO, 9524647, A1&AU , 9518620, A&EP, 698791, A1   | 1 - 5  |      |
| A   | JP, 62-69999, A (ペーリングー・マンハイム・ケセルシヤフト・ミク・ペシュレンクテル・ハフツング) 31. 3月. 1987(31. 0 3. 87)&DE, 3533288, A&EP, 218127, A&US, 4851335, A&FI, 8603752, A&KR, 8903948, B | 1 - 5  |      |
| A   | JP, 58-33012, A (ペーリングー・マンハイム・ケセルシヤフト・ミク・ペシュレンクテル・ハフツング) 30. 9月. 1983(30. 0 9. 83)&EP, 88420, A&DE, 3208253, A&US, 4544630, A                                | 1 - 5  |      |
| A   | JP, 63-126498, A (ペーリングー・マンハイム・ケセルシヤフト・ミク・ペシュレンクテル・ハフツング) 30. 5月. 1988(30. 0 5. 88)&EP, 265933, A&DE, 3636851, A&US, 4892815, A                              | 1 - 5  |      |
| <input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。   |  | <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。 |      |
| <p>* 引用文献のカテゴリー</p> <p>「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの</p> <p>「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの</p> <p>「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）</p> <p>「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</p> <p>の日の後に公表された文献</p> <p>「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</p> <p>「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「&amp;」同一パテントファミリー文献</p> |  |  |      |
| 国際調査を完了した日<br>13. 06. 97  | 国際調査報告の発送日<br>24.06.97   |  |      |
| 国際調査機関の名称及びあて先<br>日本国特許庁 (ISA/JP)<br>郵便番号 100<br>東京都千代田区霞が関三丁目4番3号  | 特許庁審査官（権限のある職員）<br>平田 和男   | 4B   | 7823 |
|   | 電話番号 03-3581-1101 内線 3448  |  |      |